

平成 29 年 6 月 11 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25850221

研究課題名(和文) 新たに見出されたNMU/NMS関連ホルモンの視床下部における生理機能の探索

研究課題名(英文) Possible involvement of novel peptides, NMU- and NMS-related peptide, in the hypothalamic function

研究代表者

丸山 圭介 (MARUYAMA, KEISUKE)

京都大学・医学研究科・特定助教

研究者番号：20612386

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、最近発見されたニューロメジンU及びS関連ホルモン(それぞれNU1、NU2とする)の生理機能の解明を目的とした。ラットにおいて、オートラジオグラフィーを用いた検討により、この新規ホルモンが特異的に結合する脳領域の存在が示唆された。そこで、NU1、NU2をラット側脳室へ投与したところ、摂食量の亢進が認められた。さらに、暗期におけるNU1、NU2の投与は、体温上昇を誘起した。また、両ホルモンの投与が自発行動量やエネルギー消費量にも影響を及ぼすことが明らかになった。これらの結果は、NU1及びNU2が機能性ホルモンであり、視床下部において生体機能調節に関与している可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to clarify the physiological functions of novel peptides, NMU- and NMS-related peptide (NU1 and NU2, respectively) in hypothalamus. The morphological analysis using autoradiography indicated the existence of specific binding sites for novel peptides in the rat brain. Intraventricular (ICV) administration of NU1 and NU2 increased the food intake. During the dark phase, ICV administration of these peptides increased the body temperature. In addition, ICV-injection of NU1 and NU2 affected the locomotor activity and the energy expenditure. These results suggest that NU1 and NU2 play important roles in the hypothalamus.

研究分野：内分泌学

キーワード：新規ホルモン 生理作用

1. 研究開始当初の背景

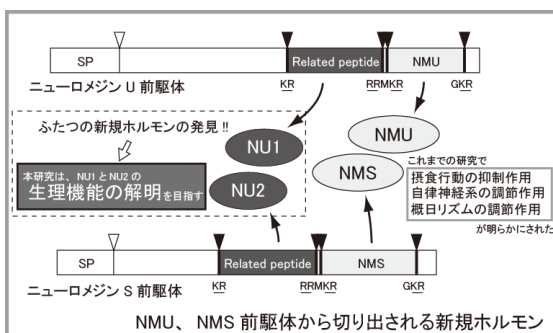
(1) 学術的背景と関連する研究動向

われわれ動物が持つ食欲、性欲、攻撃欲といった本能的機能は、個体、種の維持に必要な不可欠であり、「本能の座」とも呼ばれる視床下部に支配される。近年、中枢性あるいは末梢性のある種のペプチドホルモンが、これらの本能行動(特に摂食)を制御していることが明らかになってきた。さらに、哺乳類においてはこれら摂食制御ホルモンが自律神経系の修飾作用を介して体温調節や代謝調節などに関与し、体全体のエネルギーバランスの維持に重要な役割を果たしていることも明らかにされている。

例えば、研究代表者が関連する研究グループでは、ペプチドホルモンによるエネルギー代謝調節機構の解明が進められ、2000年にニューロメジン U (NMU) が強力な摂食抑制作用を有すると同時に、体温上昇、血圧上昇、酸素消費量の増加を誘起することを見出した(文献 . Kojima et al., 2000; 文献 . Nakazato et al., 2000)。その後、NMU と受容体を共有するニューロメジン S (NMS) が発見され、NMU と同様に摂食行動を抑制することが示された(文献 . Ida et al., 2006; 文献 . Nakahara et al., 2010)。つまり、NMU/NMS は、エネルギーの「獲得」を抑えつつ、「消費」を促進することで、エネルギーバランスを負の方向へと導く調節因子であると言える。

(2) 着想に至った経緯

研究代表者が関連する研究グループは近年、NMU と NMS の前駆体に、NMU/NMS とは異なるホルモン様配列が含まれており、プロセッシングの過程で NMU や NMS とは別のホルモン(それぞれ NU1、NU2 とする)として切り出されてくることを発見した。しかしながら、これらの新規ホルモンの生理活性は未だ不明である。特に、これまで明らかにされた NMU/NMS の摂食行動、自律神経機能の制御における生理作用と、NU1、NU2 の作用が同じもの(相加/相乗的)なのか、異なるもの(相反的)なのかは、非常に重要な問題である。アミノ酸配列を見てみると、NU1、NU2 は NMU や NMS との相同性が非常に低いことから NMU/NMS 受容体と結合するとは考えにくく、NMU や NMS とは異なる機能を有する可能性もある。



<引用文献>

Kojima et al., Purification and identification of neuromedin U as an endogenous ligand for an orphan receptor GPR66 (FM3). *Biochem Biophys Res Commun.*, 2000, 276(2), 435-8.

Nakazato et al., Central effects of neuromedin U in the regulation of energy homeostasis. *Biochem Biophys Res Commun.*, 2000, 277(1), 191-4.

Ida et al., Neuromedin s is a novel anorexigenic hormone. *Endocrinology*, 2005, 146(10), 4217-23.

Nakahara K, Katayama T, **Maruyama K** et al., Comparison of feeding suppression by the anorexigenic hormones neuromedin U and neuromedin S in rats. *J Endocrinol.*, 2010, 207, 185-93.

2. 研究の目的

上記の学術的背景に基づき、本研究は、最近発見された新規ホルモンである、ニューロメジン U 及び S 関連ホルモン(それぞれ NU1、NU2 とする)の視床下部における生理機能の解明を主たる目的とする。特に、摂食行動、や自律神経機能の制御における役割を解明することを目指す。そこで、以下の項目を検討した。

- (1) 摂食行動制御における NU1 及び NU2 の生理作用
- (2) 体温調節における NU1 及び NU2 の生理作用
- (3) 自発行動制御、エネルギー代謝、循環機能における NU1 及び NU2 の生理作用
- (4) ラット脳の遺伝子発現に及ぼす NU2 投与の影響
- (5) ラット脳における NU1 及び NU2 の結合部位の探索

3. 研究の方法

(1) ラット側脳室への NU1、NU2 の投与と行動及び生理機能の変化の解析

ラット側脳室へステンレスカニューレを留置したのち、無麻酔下において NU1 あるいは NU2 を投与し、以下の項目を調べた。尚、NU1 や NU2 には幾つかの限定切断部位があり、NU1 は 33 個[NU1 (33 aa)]あるいは 36 個のアミノ酸[NU1 (36 aa)]からなる 2 種類のペプチドが脳内で見つかっており、また NU2 には 34 個のアミノ酸から構成されるもの[NU2 (34 aa)]の他に、37 個のアミノ酸からなるもの[NU2 (37 aa)]の存在が推察されている。本研究では NU1 (33 aa) 及び NU2 (34 aa) を用いた。

・**摂食量**：側脳室投与後、経時的に残った餌重量を測定した。

・**体温(体表)**：側脳室投与後、赤外線サーモメーターで、一定時間ラット体表を連続的

に撮影し、体表温を測定した。
・自発行動量：側脳室投与後、受動型赤外線センサーにより自発行動量を測定した。
・エネルギー消費量：側脳室投与後、代謝ケージを用いて酸素消費量、二酸化炭素排出量を測定し、エネルギー消費量を算出した。
・心拍及び血圧：側脳室投与後、非観血的に測定可能な装置を用いて、心拍及び血圧を測定した。

(2) 高温、低温条件下におけるラット脳の NU1 含有量の測定

高温（35℃）あるいは低温（4℃）条件下にラットを一定時間暴露し、その後のラット脳（視床下部及び中脳・脳幹部）をサンプリングした。NU1 あるいは NU2 は、NMU や NMS と前駆体が同一のため、mRNA 発現の測定では、NU の発現量を正確に知ることができない。そこで、RIA 法により、NU1 の含有量を測定することにした。

(3) NU2 の側脳室投与後の脳における遺伝子発現の解析

ラット側脳室へ NU2 を投与したのち、ラット脳（視床下部及び中脳・脳幹部）をサンプリングし、遺伝子発現を GeneChip により網羅的に解析した。その結果、変化している傾向の認められた遺伝子に関しては、リアルタイム PCR 法により詳細に解析した。

(4) オートラジオグラフィーを用いた NU1 及び NU2 の結合部位の探索

放射線同位元素 (^{125}I) でラベルした NU1、NU2 を用いて、オートラジオグラフィー法によって結合部位を調べた。 ^{125}I 標識 NU1 あるいは、 ^{125}I 標識 NU2 をラット脳の凍結切片に添加し、フィルムカセットにセットした。その後、フィルムの感光部位を専用機器により読み取り、解析した。また、非標識 NU1 及び NU2 を用いて、検出シグナルの特異性を検討した。

4. 研究成果

(1) 摂食行動制御における NU1 及び NU2 の生理作用

摂食行動の制御機構における NU1 及び NU2 の生理作用を明らかにするため、NU1 あるいは NU2 をラット側脳室へ投与し、摂食量を経時的に調べた。明期（主観的夜）に NU1 を投与したところ、投与から 2、4、6 時間後において、摂食量の有意な増加を認めた。さらに、NU2 の側脳室内投与によっても、NU1 と同様に摂食量が有意に増加した。一方で、暗期（主観的昼）においては、NU1 あるいは NU2 投与群とコントロール群の摂食量は同程度であり、NU1、NU2 投与による影響は認められなかった。

(2) 体温調節における NU1 及び NU2 の生理作用

NU1、NU2 の脳室内投与が体温に及ぼす影響

体温調節の制御機構における NU1 及び NU2 の生理作用を明らかにするため、NU1 あるいは NU2 をラット側脳室へ投与し、その後の体温変化を経時的にモニターした。明期に NU1 あるいは NU2 を 1 nmol 投与したところ、投与から数分後にコントロール群の体温よりも低い値を示しはじめ、投与 40 分後まで、NU1、NU2 投与群の体温はコントロール群のそれよりも低下していた。一方、暗期において NU1、NU2 を 1 nmol 投与したところ、投与から数分後にはコントロール群よりも高値を示し、それは投与から 60 分後まで維持された。しかし、投与量を 2 nmol としたところ、暗期においても投与数分後から体温の低下を認めた。

NU1、NU2 の体温調節作用に及ぼすインドメタシンの影響

後述する研究成果項目(4)において、NU1 あるいは NU2 の体温上昇作用には、プロスタグランジン経路が関与している可能性が見出された。そこで、シクロオキシゲナーゼの阻害剤であるインドメタシンが、暗期における NU1 及び NU2 の体温上昇作用に及ぼす影響を調べた。暗期において、ラット側脳室へインドメタシンを前投与し、その 30 分後に NU1 あるいは NU2 を投与して、その後の体温変化をモニターした。その結果、インドメタシン前投与により、NU1 及び NU2 の体温上昇作用が阻害されることが明らかとなった。

高温、低温条件下におけるラット脳の NU1 含有量の変化

NU の体温調節作用を探る一助として、高温あるいは低温条件下における NU の発現変化を調べた。本項目では、ラットを一定時間、高温あるいは低温条件に暴露し、その後のラット脳をサンプリングして、RIA 法により NU1 の含有量を測定した。その結果、低温暴露により中脳・脳幹部における NU1 の含有量が、コントロール群のそれと比べて減少することが見出された。また、視床下部においても NU1 含有量が減少している傾向が認められた。一方、高温条件下においては顕著な変化は認められなかった。

(3) 自発行動制御、エネルギー代謝、循環機能における NU1 及び NU2 の生理作用

NU2 の脳室内投与が自発行動量に及ぼす影響

NU2 をラット側脳室へ投与し、その後の自発行動量を赤外線センサーにより経時的に調べた。その結果、明期において 1 nmol の NU2 を投与したところ、投与後 20 分間はコントロール群と比べて行動量が減少したが、投与から 20～120 分後までは、コントロール群よりも行動量が増加した。一方、暗期にお

ける NU2 投与は、投与直後に行動量が減少したものの、その後はコントロール群と同程度の行動量を示した。

NU1、NU2 の脳室内投与がエネルギー消費量に及ぼす影響

NU1 あるいは NU2 をラット側脳室へ投与し、その後のエネルギー消費量を、代謝ケージを用いて算出した。その結果、NU1、NU2 ともに、側脳室投与によりエネルギー消費量が増加する傾向が認められた。

NU1、NU2 の脳室内投与が心拍・血圧に及ぼす影響

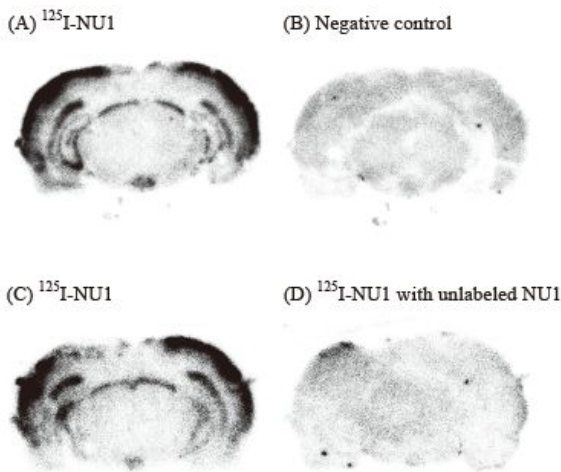
NU1 あるいは NU2 をラット側脳室へ投与し、心拍及び血圧を非観血的に測定した。その結果、血圧に変化は認められなかった。一方、NU1 投与群及び NU2 投与群の心拍数は、コントロール群のそれよりも増加した。

(4) ラット脳の遺伝子発現に及ぼす NU2 投与の影響

NU の生理機能を探る一助として、NU2 投与後のラット脳(視床下部及び中脳・脳幹部)をサンプリングし、GeneChip により、遺伝子発現の変化を網羅的に検索した。その結果、摂食制御に関連する既知のペプチドホルモンに関しては、遺伝子発現が大きく変化するものは検出されなかった。しかしながら、体温調節に関連するシクロオキシゲナーゼ及びプロスタグランジン E 合成酵素の遺伝子発現が増加している可能性が見出された。そこで、両遺伝子の発現変化をリアルタイム PCR 法により詳細に解析した。その結果、視床下部及び中脳・脳幹部の両領域において、シクロオキシゲナーゼ及びプロスタグランジン E 合成酵素の遺伝子発現が増加していることが明らかになった。

(5) ラット脳における NU1 及び NU2 の結合部位の探索

NU1 及び NU2 の生理作用の標的となる脳領域を探索するため、¹²⁵I 標識 NU1 あるいは



¹²⁵I 標識 NU1 を用いたラット脳におけるオートラジオグラフィー

¹²⁵I 標識 NU2 を用いて、オートラジオグラフィー法によって結合部位を調べた。その結果、左下図のように、¹²⁵I 標識ペプチド添加に特異的なシグナルを検出した。すなわち、脳において、この新規ホルモンが作用する領域が存在する可能性があることが示された。

(6) 総括

本研究は、ニューロメジン U (NMU) 及びニューロメジン S (NMS) の前駆体より切り出される新規ホルモン、NU1 及び NU2 の生理機能の解明を目的とし、上記の結果を得た。

新規ホルモンである NU1 及び NU2 の特異的受容体は全く不明であるが、オートラジオグラフィーを用いた検討により、この新規ホルモンが作用する脳領域が存在する可能性があることが示された。さらに、NU1 及び NU2 がいくつかの生理作用を有し、視床下部における生理機能の制御に関与していることが示唆された。興味深いことに前駆体を共有する NMU、NMS の生理作用とは完全には一致しなかった。例えば、NMU/NMS はどちらも摂食抑制作用を有することが知られている。しかし、本研究において NU1、NU2 の投与は、NMU/NMS とは異なり摂食量の亢進を誘起した。一方で、体温調節においては、NU1、NU2 が NMU や NMS と同じ作用を持つ可能性が示唆された。NMU/NMS の投与は体温を著しく上昇させるが、暗期における NU1、NU2 の投与は、NMU/NMS と同様に体温上昇を誘起した。しかしながら、明期においては NU の投与により体温低下を認めたことから、まだ不明な点も残る。

これらの成果は、新規ホルモン NU1 と NU2 の生理的役割を考察する上で、重要な見となる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

Suzuki Y, Nakahara K, Maruyama K, Okame R, Ensho T, Inoue Y, Murakami N. Changes in mRNA expression of arcuate nucleus appetite-regulating peptides during lactation in rats. *J Mol Endocrinol.*, 2014, 52(2), 97-109.

DOI: 10.1530/JME-13-0015 査読有り
Nakahara K, Bannai M, Maruyama K, Suzuki Y, Okame R, Murakami N. Characterization of a novel genetically obese mouse model demonstrating early onset hyperphagia and hyperleptinemia. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*, 2013, 305(3), E451-63.

DOI: 10.1152/ajpendo.00540.2012 査読

有り

〔学会発表〕(計 8 件)

丸山圭介、宮澤崇、中尾一和、寒川賢治
病態モデル動物からの生理活性ペプチド
の探索 第 37 回日本肥満学会 (2016 年
10 月 7 日~8 日) 東京ファッションタ
ウンビル (東京都江東区)

丸山圭介、宮澤崇、中尾一和、寒川賢治
肥満減量手術モデル動物からの生理活性
ペプチドの探索 第 13 回 GPCR 研究会
(2016 年 5 月 13 日~14 日) 日本科学未
来館 (東京都江東区)

丸山圭介、宮澤崇、中尾一和、寒川賢治
肥満減量手術モデルラットにおけるグル
コース応答性インスリン分泌の改善 第
89 回日本内分泌学会学術総会 (2016 年 4
月 21 日~23 日) 国立京都国際会館 (京
都府京都市)

Maruyama K, Miyazawa T, Nakao K,
Kangawa K. Roux-en-Y gastric bypass
improves glucose-responsive insulin
release in the Wistar fatty rat. Obesity
week 2015. (2015/11/2-7) Los Angeles
convention center (Los Angeles USA).

丸山圭介、宮澤崇、中尾一和、寒川賢治
肥満減量手術モデルラットにおける消化
管ペプチドホルモンの発現変化 第 36
回肥満学会 (2015 年 10 月 2 日~3 日) 名
古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)

丸山圭介、宮澤崇 病態モデル動物から
の生理活性ペプチド探索 第 5 回ペプ
チド・ホルモン研究会 (2014 年 12 月 13 日)
旭川医科大学 (北海道旭川市)

丸山圭介、宮澤崇、山下貴裕、篠原寛美、
土手克子、中尾一和、寒川賢治 ラット
における肥満減量手術モデルの確立 第
35 回肥満学会 (2014 年 10 月 24 日~25
日) 宮崎県シーガイアコンベンションセ
ンター (宮崎県宮崎市)

宮澤崇、丸山圭介、山下貴裕、篠原寛美、
土手克子、中尾一和、寒川賢治
Roux-en-Y (RYGB) モデルラットにおける
血糖低下作用の検討 第 35 回肥満学会
(2014 年 10 月 24 日~25 日) 宮崎県シー
ガイアコンベンションセンター (宮崎県
宮崎市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

なし

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丸山 圭介 (MARUYAMA Keisuke)
京都大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号: 20612386

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し

(4) 研究協力者

村上 昇 (MURAKAMI Noboru)